



# NATURES®

## Beta glucan



Gennaio 2009

© Natures s.r.o.

[www.natures.sk](http://www.natures.sk)



# Indice

<b>1. Chimica</b> .....	<b>3</b>
1.1. <i>β-D-glucani</i> .....	4
1.2. <i>Eteropolisaccaridi e glicoproteine</i> .....	5
1.3. <i>Fibre dietetiche</i> .....	5
<b>2. Fonti di β-glucani</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Sistema immunitario</b> .....	<b>6</b>
3.1. <i>Come funziona il sistema immunitario</i> .....	6
3.2. <i>Il β-glucano come immunomodulatore</i> .....	7
3.3. <i>Il cancro</i> .....	8
3.4. <i>Il colesterolo</i> .....	9
3.5. <i>Patologie in generale</i> .....	9
<b>4. Estrazione, frazionamento, purificazione e modificazione chimica</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Sulla società Natures s.r.o.</b> .....	<b>11</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>12</b>

Negli ultimi tre decenni sono stati isolati dai funghi numerosi polisaccaridi e complessi di polisaccaride – proteina che vengono utilizzati come sostanze terapeutiche. Gli effetti farmacologici più promettenti di questi biopolimeri sono la loro facoltà immunomodulante e i loro effetti anticancerogeni.

Gli estratti da funghi sono molto noti nella medicina tradizionale asiatica. L'utilizzo di questi cosiddetti funghi medicinali è ampiamente documentato in Cina, Giappone, Corea, Russia e negli ultimi tempi anche negli Stati Uniti (Mizuno e colleghi, 1995). Tuttavia solo il progresso tecnologico nelle tecniche estrattive degli ultimi trent'anni ha reso possibile estrarre i glucani e utilizzarli in modo più serio in esperimenti controllati. I glucani sono stati studiati molto intensamente in particolare per il loro effetto anticancerogeno e immunomodulante (Mizuno, 1999). Numerosi funghi sono stati identificati come ricche fonti di glucani con un influsso positivo sul sistema immunitario di essere umani e animali (Wasser e colleghi, 1999a; Borchers e colleghi, 1999; Kidd, 2000; Ikekawa, 2000; Feng e colleghi, 2001). Benché siano stati identificati circa 30 specie di funghi aventi un effetto anticancerogeno solo alcuni di essi sono stati soggetti a un'intensa attività di studio.

## 1. Chimica

I composti con un effetto anticancerogeno rilevante sono isolati industrialmente da funghi superiori e sono stati identificati come betaglucani solubili in acqua oppure come complessi di  $\beta$ -D-glucano+proteina – proteoglucani.

Il betaglucano è un polisaccaride naturale, dal punto di vista chimico si tratta di un omopolimero del D-glucosio. Una forma attiva è data dal beta-1,3-D glucano con catene laterali di 1,6 glucani, presente soprattutto nei lieviti e in altri organismi fungini, i più idonei da un punto di vista industriale sono i funghi da carie del legno. In natura si riscontrano anche altre forme di glucani, soprattutto derivate da cereali (avena e orzo), che sono tuttavia costituite di molecole di glucosio unite da legami 1,4.

I glucani sono polisaccaridi a catena lunga, il cui unico componente strutturale è il glucosio (esosio), legato alla catena da legami in posizione 1 e 3. Catene laterali minori si diramano dalla catena principale del polisaccaride. La forma più attiva di beta-1,3-D glucani è data dai betaglucani contenenti catene laterali nelle posizioni 1,6, che si ramificano dalla catena principale di beta-1,3-glucano. Per questo motivo in alcune fonti si riporta il beta-1,3-glucano come pure il  $\beta$ -1,3/1,6 glucano. La frequenza, la collocazione e la lunghezza della catena laterale determinano l'azione sul sistema immunitario in misura di gran lunga maggiore rispetto alla catena principale di betaglucano. Questo presupposto fondamentale dell'attività biologica non è tuttavia così univoco. I glucani esistono in forma fibrosa, come pure sotto forma di catene elicoidali a due o tre fibre. Da quanto riportato emerge che l'attività biologica (l'attività nel sistema immunitario) è data da molteplici fattori: dal peso molecolare, dalla forma, dalla struttura, dal grado di ramificazione e dalla fonte di  $\beta$ -1,3-glucano.

Da un punto di vista strutturale i polisaccaridi sono un gruppo molto vario di macromolecole con una diffusione molto ampia in natura. Sono composti di unità strutturali che si ripetono – i monosaccaridi – unite tra loro a formare un polimero da legami glicosidici. I polisaccaridi possiedono un'alta capacità di trasporto di informazioni grazie alla loro variabilità strutturale (Sharon e colleghi, 1993). Conseguenza di tale variabilità è il preciso meccanismo regolatore di molteplici interazioni tra le cellule degli organismi superiori, incluso l'essere umano.

I primi studi definitivi delle componenti anticancerogene arrivarono sul finire degli anni Sessanta (Ikekawa e colleghi, 1968, 1969; Chinara e colleghi, 1969). Questi autori dimostrarono che gli estratti di numerosi funghi presentano spiccati effetti anticancerogeni. Il metodo estrattivo era in confronto ai procedimenti odierni molto semplice, si trattava di estrazione con acqua calda, ciononostante era possibile isolare numerosi polisaccaridi.

## 1.1. $\beta$ -D-glucani

Il betaglucano di base è una struttura che si ripete con unità di D-glucosio legate in una catena lineare di legami beta ( $\beta$ ). Questa catena di seguito si ramifica in carboni del gruppo dei saccaridi, e ciò in carbonio 1 e 3 ( $\beta$  1-3), in carbonio 1 e 4 ( $\beta$  1-4) o in carbonio 1 e 6 ( $\beta$  1-6). La ramificazione di base più frequente è quella  $\beta$  1-3 e  $\beta$  1-4 oppure la ramificazione mista  $\beta$  1-3,  $\beta$  1-4 e  $\beta$  1-6. La struttura fondamentale è riprodotta nelle figure 1 e 2 (struttura fondamentale  $\beta$  1-3 con catene laterali nelle posizioni  $\beta$  1-6).

L'effetto anticancerogeno dei  $\beta$ -glucani è direttamente dipendente dal loro peso molecolare, dalla ramificazione e dalla solubilità in acqua. Lo studio della loro struttura sterica mediante analisi effettuate con la Risonanza Magnetica Nucleare e la diffrazione Röntgen ha dimostrato che i  $\beta$ -glucani attivi hanno la struttura di una triplice elica destrorsa (Bluhm e colleghi, 1977). Non tutti i  $\beta$ -D-glucani che si trovano nei funghi rivelano un effetto anticancerogeno. Tale effetto è influenzato direttamente dalla solubilità in acqua, dalla grandezza della molecola e dal sistema  $\beta$  1-6 con cui si lega alla catena principale  $\beta$  1-3. Alcuni  $\beta$ -glucani non solubili sono solubili in un ambiente alcalino e quindi sono in grado di manifestare un effetto anticancerogeno (Bohn e colleghi, 1995).

Fig. 1 Formula fondamentale della molecola di un  $\beta$ -glucano fungino (Kidd, 2000)

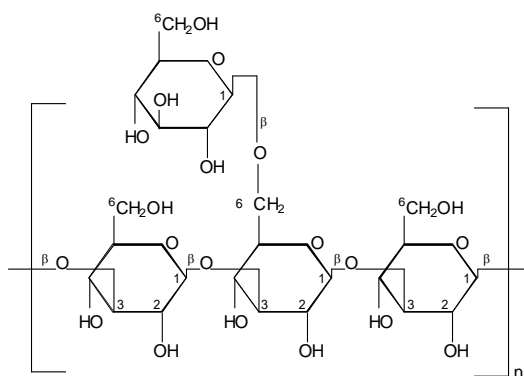
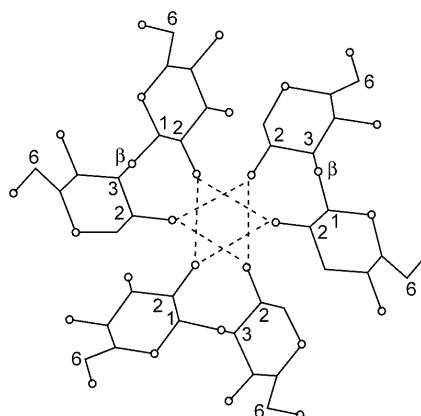


Fig. 2 Struttura (modello) della triplice elica destrorsa del  $\beta$ -glucano con effetto anticancerogeno (Schizophyllan) (Mizuno, 1999)



In tutto il mondo si utilizzano commercialmente soprattutto i  $\beta$ -glucani Lentinan (*Lentinus edodes*) e Schizophyllan (*Schizophyllum commune*), e ciò per il loro forte effetto anticancerogeno. Essi si compongono di una catena principale costituita di unità di  $\beta$ -D-glucopiranosio unite nelle posizioni 1-3, la catena laterale è costituita anch'essa di unità di glucopiranosio legate nelle posizioni 1-6. In media una ramificazione fa capo a tre unità principali, il grado di ramificazione DB 0,33 (DB – degree of branching), il peso molecolare si muove attorno a 450 000 – 500 000 (Sasaki e colleghi, 1976). Il peso molecolare tuttavia si può differenziare. Si presuppone che la risposta immunitaria alla presenza di  $\beta$ -glucani possa essere parzialmente aspecifica e determinata dalla struttura chimica come pure dalla grandezza (peso) (Bohn e colleghi, 1995). Come già detto sopra, l'effetto anticancerogeno è in misura significativa influenzato dalla struttura della triplice elica ed è, altresì, molto probabile che abbiano un'influenza importante anche i gruppi idrofili presenti sul lato esterno dell'elica. Un'elevata solubilità in acqua può avere un'influenza positiva sull'effetto anticancerogeno, pare che sia importante anche la posizione dei gruppi sostitutivi (Bohn e colleghi, 1995).

I  $\beta$ -glucani isolati da altri tipi di funghi hanno una struttura lievemente diversa (Ohno e colleghi, 1988) ed è stato dimostrato che la struttura a elica triplice con un maggior peso molecolare dei  $\beta$ -D-glucani rivela un effetto immunomodulante (Maeda e colleghi, 1988). Solo i  $\beta$ -glucani con un maggior peso molecolare formano la struttura a triplice elica, stabilizzata da unità di  $\beta$ -D-glucopiranosio nelle catene laterali (Saito e colleghi, 1991).

Recenti studi hanno dimostrato che la concentrazione di polisaccaridi in certe specie di “funghi medicinali” può dipendere dalle fasi della crescita (fungo giovane, maturo o vecchio), come pure dal tempo che intercorre tra la raccolta e la lavorazione, naturalmente hanno la loro importanza anche le condizioni di conservazione (Minato e colleghi, 1999, 2001). Le proprietà immunomodulanti degli estratti dal fungo *Lentinus edodes* hanno subito una rapida riduzione dopo che i funghi erano stati conservati a una temperatura di 20°C per 7 giorni, mentre questo cambiamento di caratteristiche non avviene se conservati a una temperatura compresa tra 1°C e 5°C. L’abbassamento è causato dall’abbassamento di concentrazione del polisaccaride Lentinan, che a una temperatura di 20°C si degrada a causa dell’attività enzimatica interna della  $\beta$ -glucanasi (Minato e colleghi, 1999). Esperimenti simili con le proprietà immunomodulanti sono stati realizzati con funghi *L. edodes* e *G. frondosa*, la crescita dell’attività immunomodulante durante la crescita e la formazione dei gambi dei funghi nelle fasi più tardi della maturazione del fungo è seguita da un calo di tale attività (e quindi da un calo della concentrazione di polisaccaridi) (Minato e colleghi, 2001).

## 1.2. Eteropolisaccaridi e glicoproteine

Mentre i  $\beta$ -glucani solubili in acqua si trovano in larga misura nei funghi, alcuni tipi contengono anche  $\beta$ -D-glucani con una catena eteropolisaccaride di xilosio, mannosio, galattosio e di acido uronico. Altri tipi possono contenere polisaccaridi peptidi o glicoproteine, che sono catene polipeptidiche oppure piccoli peptidi, cui il polisaccaride  $\beta$ -D-glucano è stabilmente collegato (Boldizar e colleghi, 1998) (vedi fig. 3).

## 1.3. Fibre dietetiche

Le sostanze altomolecolari, che sono escluse dall’organismo senza essere digerite e assorbite si chiamano fibre. I funghi contengono queste fibre. Si tratta di  $\beta$ -glucani, di chitine e di eteropolisaccaridi (emicellulosa, sostanze pectiniche, ecc.), che nella materia secca possono costituire fino al 10-50% del contenuto. La maggior parte di polisaccaridi attivi, solubili o meno nell’acqua, isolata dai funghi può essere classificata come fibra (fibre), ossia  $\beta$ -glucani, xiloglucani, eteroglicani, componenti chitinarie, o i loro complessi proteinici. Molte di queste sostanze hanno un effetto carcinostatico e dal punto di vista delle interazioni fisico-chimiche assorbono le possibili sostanze carcinogene nel tratto digerente e rendono così possibile la loro esclusione dall’organismo (Mizuno, 1996).

Fig. 3 Struttura molecolare di proteoglicano



## 2. Fonti di $\beta$ -glucani

La fonte più comune di  $\beta$ -glucani sono le pareti delle cellule dei lieviti per panificazione *Saccharomyces cerevisiae*. Altre fonti sono i chicchi di alcuni cereali (il contenuto oscilla tra 1 e 7 %) e i funghi superiori (il contenuto di  $\beta$ -glucani nei funghi da carie del legno oscilla tra il 10 e il 30%) (Teas, 1983; Wasser e colleghi, 1999).

Il fungo *Pleurotus ostreatus*, Hiratake, possiede i migliori valori nutritivi tra i funghi da carie del legno utilizzati industrialmente. Il  $\beta$ -1,3-D glucano isolato da questi funghi possiede uno spiccato effetto

anticancerogeno, il fungo per giunta contiene una grande quantità di proteine e carboidrati, 8 aminoacidi essenziali (eccetto il triptofano) come pure le vitamine B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (acido pantotenico), B7 (biotina), C e PP ed elementi minerali (calcio, magnesio, fosforo, potassio, selenio, sodio e zinco). L'alto contenuto di polisaccaridi, come pure la loro purezza e la convenienza economica dell'isolamento e della purificazione fa del  $\beta$ -1,3-D glucano isolato dal *Pleurotus ostreatus* un prodotto attraente dal punto di vista del prezzo e della qualità.

Numerosi funghi *Basidiomycetes*, se non tutti, rivelano la presenza di polisaccaridi biologicamente attivi anticancerogeni e immunostimolanti. In studi recenti (Reshetnikov e colleghi, 2001) si parla addirittura di ben 650 tipi di 182 specie di omo e eterobasidiomiceti superiori, che contengono polisaccaridi farmacologicamente attivi, che è possibile isolare.

Altri funghi sfruttati per il loro contenuto di betaglucani sono *Grifola frondosa* (Maitake), *Lentinula edodes* (Shitake), *Schizophyllum commune*, *Coriolus versicolor*. Tutti i funghi citati sono dei basidiomiceti superiori (Basidiomycetes).

### 3. Sistema immunitario

Il sistema immunitario è un sistema complesso e altamente sviluppato, anche se il suo ruolo è tutto sommato semplice e cioè trovare nell'organismo le sostanze estranee ed eliminarle. Il sistema immunitario è un insieme di diversi organi, tessuti, cellule, molecole e reazioni. Gli organi del sistema immunitario che si trovano in tutto il nostro corpo sono denominati organi linfatici (sistema linfatico, dalla parola greca "lymph" – corrente pulita): le ghiandole linfatiche, il midollo osseo, il timo (ghiandola infantile), le tonsille (ghiandole del collo), le adenoidi (ghiandole nasali), le placche di Peyer, l'appendice, ecc. Le ghiandole linfatiche e i vasi costituiscono parte del sistema circolatorio, che trasporta la linfa – un liquido limpido, che contiene i globuli bianchi, in particolare i linfociti. Il sistema circolatorio dei vasi linfatici opera in collaborazione con il sistema sanguigno.

Le cellule immunitarie e le particelle estranee entrano nelle ghiandole linfatiche attraverso il sistema vascolare oppure i vasi linfatici. Le cellule immunitarie hanno la capacità di lasciare il sistema linfatico ed eventualmente di fare ritorno nel sistema vascolare. Non appena ciò accade, i linfociti sono trasportati verso i tessuti di tutto il corpo e sono preparati alla reazione con l'antigene (la particella estranea).

#### 3.1. Come funziona il sistema immunitario

Nel midollo osseo si producono cellule che durante lo stadio di maturazione possono svilupparsi in diversi tipi di cellule immunitarie. Il midollo osseo è ricco di sostanze nutritive, di consistenza spugnosa e si trova nelle parti centrali di alcune ossa piatte o lunghe.

I linfociti si suddividono in due gruppi principali: i linfociti B, che maturano nel midollo osseo e i T-linfociti, che maturano nel timo. I linfociti B producono anticorpi, che circolano nella linfa e nel sangue e a contatto con l'antigene lo segnano, affinché gli altri tipi di cellule immunitarie lo possano eliminare. I linfociti B sono parte di qualcosa che in immunologia si definisce come immunità mediata dagli anticorpi o immunità umorale. La definizione deriva dalla parola greca "humors", che era denominazione greca per il sangue e la linfa in cui gli anticorpi circolano.

Alcuni tipi di linfociti T, che circolano nel sangue e nella linfa, hanno facoltà maggiori rispetto a quella di marcare l'antigene: sono in grado di attaccare e distruggere cellule estranee. I linfociti T sono responsabili dell'immunità mediata dalle cellule (o immunità cellulare). I linfociti T, inoltre, organizzano, regolano e coordinano l'intera risposta immunitaria. Per identificare gli antigeni si avvalgono di una speciale molecola superficiale: il sistema principale istocompatibile (HLA).

Gli anticorpi, che sono prodotti dai linfociti B, sono i modelli principali con una speciale parte, altamente specifica per il dato antigene. La varietà di anticorpi è molto ampia, i vari anticorpi sono destinati a diversi scopi. Alcuni hanno la facoltà di coprire la particella estranea e di “renderla attraente” per i fagociti, cioè le cellule che hanno la facoltà di fagocitare questa particella e di renderla così innocua. Non appena l’antigene si lega all’anticorpo, si verifica l’attivazione del complemento, il sistema contenente 9 proteine, che circolavano nell’organismo in forma inattiva. Il complemento collabora con gli anticorpi che hanno già reagito con l’antigene allo scopo di distruggere la particella estranea ed eliminarla dal corpo.

Tra questi annoveriamo i linfociti T, che hanno due funzioni fondamentali nel sistema immunitario: i linfociti T regolatori sono indispensabili per l’organizzazione della risposta mediante diversi tipi di cellule immunitarie. I linfociti T ausiliari (noti anche come linfociti T CD4 positivi) avvertono i linfociti B, affinché inizino a produrre gli anticorpi. Essi possono attivare anche altri linfociti T oppure i macrofagi (cellule del sistema immunitario, che raccolgono le particelle, che sono state “rigettate” o sono inutili), come pure determinare il tipo di anticorpo che deve essere prodotto. Fanno inoltre parte di questi alcuni linfociti T (CD8 positivi), che possono divenire le cosiddette cellule Killer, che attaccano e distruggono la cellula infetta.

Dopo aver fagocitato e elaborato l’antigene il macrofago esibisce frammenti di antigene e proteina HLA di classe II sulla propria superficie cellulare. La combinazione di antigene-anticorpo interessa i linfociti T ausiliari e assicura la loro attivazione. Semplificando: antigene+macrofago+HLA di classe II => elaborazione dell’antigene => antigene elaborato +HLA di classe II appaiono sulla superficie del macrofago => il linfocita T inattivo li riconosce e si associa => linfocita T ausiliare attivato. Il processo di legamento (connessione) stimola la trasformazione del linfocita B in plasmacellula, che secerne gli anticorpi.

Dopo che il macrofago ha fagocitato ed elaborato l’antigene, ne mostra sulla propria superficie i frammenti assieme alla proteina HLA di classe I. Il recettore riconosce nel linfocita T citotossico circolante il complesso antigene-proteina e si lega a esso. Il processo di legamento e il linfocita T ausiliare attivano il linfocita T citotossico che può poi attaccare e distruggere la cellula malata.

### 3.2. Il $\beta$ -glucano come immunomodulatore

È dimostrato sperimentalmente e clinicamente che i polisaccaridi glucanici e i loro complessi polisaccaride-proteina aumentano la reazione immunitaria mediata dalle cellule *in vivo* e *in vitro* e agiscono come modulatori della risposta immunitaria dell’organismo. Il potenziamento del sistema immunitario può condurre all’attivazione di molti tipi di cellule immunitarie, che sono essenziali per il verificarsi dell’omeostasi (Ooi e colleghi, 2000).

Durante gli ultimi trent’anni trascorsi circa la medicina occidentale ha iniziato a occuparsi seriamente dei funghi medicinali, ossia dei polisaccaridi da essi isolati. La causa sono appunto gli effetti immunomodulanti e anticancerogeni di questi polisaccaridi. I  $\beta$ -1,3-D glucani influiscono notevolmente sulla funzionalità del sistema immunitario, l’immunità migliorata si manifesta poi in una migliore difesa da virus, parassiti, batteri, come pure dalla crescita aberrante di cellule (Wasser e colleghi, 1999). Oltre agli effetti immunomodulanti citati, il  $\beta$ -glucano riduce il colesterolo, è un coadiuvante nella terapia di infezioni, pressione sanguigna alta e nella prevenzione e nella terapia del cancro (Welch, 1994). I polimeri di glucosio, di cui è composto il  $\beta$ -glucano, manifestano anch’essi un influsso positivo sulla crescita di ceppi probiotici di batteri nel tratto intestinale (Jaskari e colleghi, 1998) e migliorano il profilo dei lipidi sanguigni (Nicolosi e colleghi, 1999)

Il beta-1,3-glucan si qualifica come sostanza atta a modificare la risposta biologica (reazione) dell’organismo, a causa della propria capacità di preparare il sistema immunitario all’azione (Miura e colleghi, 1996). È necessario tuttavia distinguere l’effetto del betaglucano dalle sostanze stimolanti il sistema immunitario. L’effetto delle sostanze stimolanti il sistema immunitario può condurre a un’eccessiva reazione dell’organismo e causare così patologie autoimmuni. Il  $\beta$ -1,3-glucano incrementa l’“efficienza” del sistema immunitario senza che si pervenga a una sua eccessiva reazione. La modulazione del sistema immunitario da parte dei  $\beta$ -glucani può

essere mediata dalla mutata attività dei macrofagi e delle cellule T (linfociti), che deriva dalla produzione e dall'espressione di varie citochine (Borchers e colleghi, 1999). L'azione dei macrofagi si manifesta con la loro aumentata funzionalità, quale la ricerca e l'eliminazione di sostanze estranee nel corpo, come per esempio di batteri, virus e parassiti, incrementa la produzione di citochine (per esempio del TNF – tumor necrosis factor) e di alcuni sottogruppi di linfociti T e aumenta altresì la reazione immunitaria specifica e aspecifica dell'organismo (Chihara, 1992; Czop e colleghi, 1989). L'assorbimento nell'organismo si verifica grazie all'aiuto di enterociti, il  $\beta$ -1,3-D glucano e le sostanze a esso affini sono trasportate attraverso le pareti cellulari del tratto intestinale nella linfa, dove reagiscono con i macrofagi e incrementano la funzionalità del sistema immunitario.

### 3.3. Il cancro

L'effetto anticancerogeno del  $\beta$ -glucano può essere locale o sistemico. L'applicazione locale di una sospensione di  $\beta$ -1,3-D glucano nella zona interessata da melanomi ha condotto a un miglioramento delle condizioni a livello locale (Mansell e colleghi, 1978). L'applicazione locale di  $\beta$ -glucano ha portato al controllo della crescita delle metastasi di alcuni tumori, che tuttavia dopo la sospensione dell'applicazione del  $\beta$ -glucano hanno nuovamente ripreso a crescere.

Malauguratamente i test clinici con uso di  $\beta$ -glucano nella terapia del cancro sono iniziati soltanto dopo un silenzio piuttosto lungo negli anni Ottanta e l'attenzione è cresciuta nell'ultimo decennio. Numerosi studi tuttavia sono stati eseguiti sugli animali.

L'applicazione sistematica di  $\beta$ -glucano su animali colpiti da tumori ha condotto alla riduzione della crescita dei tumori e al prolungamento della vita dei topi osservati con melanomi impiantati. La diminuzione della massa del tumore ha raggiunto l'85%. La somministrazione di  $\beta$ -glucano a topi colpiti da leucemia ha portato a un allungamento della vita (DiLuzio e colleghi, 1980). In questi esperimenti è stato confermato che l'attivazione sistematica dei macrofagi e di alcune citochine da parte del  $\beta$ -glucano è determinante per l'epurazione dei tessuti dalle cellule tumorali e l'inibizione delle metastasi (Sakurai e colleghi, 1991).

L'applicazione di  $\beta$ -glucano può anche proteggere i pazienti dalla leucocitopenia (patologia accompagnata dal calo dei leucociti periferici), che si sviluppa come sintomo collaterale durante la chemioterapia ed è una delle difficoltà principali in caso di chemioterapia del cancro. La diminuzione di leucociti periferici determinata dalla somministrazione di 5-fluorouracile viene prevenuta con la somministrazione orale di glucano negli esperimenti sui topi. Il  $\beta$ -glucano incrementa il numero delle citochine, in particolare delle interleuchine IL-1 e IL-6, in quanto conseguenza dell'azione sui fattori che stimolano le colonie di granulociti e di macrofagi (Miyazaki e colleghi, 1992).

Numerosi studi indipendenti tra di loro hanno confermato che il betaglucano ha effetto anticancerogeno e antitumorale (Morikawa e colleghi, 1985; Luzio e colleghi, 1980). Il segno principale dell'effetto del  $\beta$ -glucano sulle cellule tumorali è la diminuzione (riduzione) del peso dei tumori. Nello studio dell'effetto sui topi, in combinazione con l'interferone gamma (INF gamma), grazie all'influsso del betaglucano è stata inibita la creazione di tumori e di metastasi sul fegato. Durante lo studio su esseri umani, i beta 1,3 D glucani isolati dai funghi Shiitake durante l'applicazione congiunta di chemioterapia (mitomicina C + 5-fluorouracile), hanno incrementato la misura di sopravvivenza dei pazienti rispetto al gruppo di controllo, soggetto alla sola chemioterapia (Wakui e colleghi, 1980; Mansel e colleghi, 1975). Negli studi sugli animali è stato sperimentalmente dimostrato che i glucani hanno anche la facoltà di migliorare lo stato complessivo dell'organismo in seguito all'esposizione a radiazioni (il che dipende dall'influsso complessivamente positivo dei betaglucani sul sistema immunitario), in particolare il rinnovarsi delle funzioni del midollo osseo e l'aumento del numero di globuli bianchi (Patchen e colleghi, 1984; Petrucenko, 1984).



### 3.4. Il colesterolo

Nelle fibre d'avena si trovano proprio i betaglucani che sono il fattore principale di riduzione del colesterolo. Le ricerche dimostrano che i glucani solubili presenti nel chicco d'avena hanno la facoltà di ridurre il colesterolo complessivo, come pure il colesterolo LDL in pazienti con ipercolesterolemia (Davidson e colleghi, 1991; Braaten e colleghi, 1994). Un effetto analogo di riduzione del colesterolo è stato dimostrato anche nei glucani isolati dall'orzo (McIntosh e colleghi, 1991; Wallmark e colleghi, 1999; Behall e colleghi, 1997).

### 3.5. Patologie in generale

Diversi tipi di tossine provenienti da fonti di infezioni sia interne sia esterne fanno in modo che i leucociti liberino le citochine antinfiammatorie, che possono portare a una serie di reazioni chimiche nell'organismo, che terminano con lo shock settico. L'amministrazione (somministrazione) di  $\beta$ -1,3-glucani riduce la produzione di citochine pro-infiammatorie, in particolare il tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), che riduce la mortalità (Soltys e colleghi, 1999; Abel e colleghi, 1992).

Durante lo studio su 41 pazienti con diverse ferite (senza infezioni), cui è stato somministrato il beta 1,3 D glucano oppure il placebo è stato accertato che rispetto al gruppo di controllo soltanto 2 pazienti su 21 rivelava pneumonia – polmonite (gruppo di controllo 11 su 20). La sepsi (avvelenamento del sangue) si è sviluppata nel 35% dei casi del gruppo di controllo contro il 9,5% nel gruppo di pazienti in terapia con  $\beta$ -glucano. La morte causata dall'infezione e la mortalità complessive sono state nel gruppo di controllo del 30% o del 42,1% rispetto il 4,8%, o 23,5% nel gruppo cui è stato somministrato il beta 1,3 D glucano (de Felipe Junior e colleghi, 1993).

Negli esperimenti sui topi è stato dimostrato l'effetto sinergico del  $\beta$ -glucano e dell'antibiotico ampicillina nella peritonite. Il 100% di sopravvissuti è stato il risultato della terapia combinata, mentre il  $\beta$ -glucano da solo ha portato soltanto al 30% di sopravvissuti e gli antibiotici al 65%. I risultati sono statisticamente corrispondenti, l'esperimento è stato eseguito su diversi gruppi di controllo (Lahnborg e colleghi, 1982). Tentativi simili sono stati realizzati su topi durante la terapia con l'antibiotico gentamicina e la contemporanea somministrazione di  $\beta$ -glucano in una quantità di 0,1 mg per topo la misura della sopravvivenza è aumentata dal 10% al 56% (Browder e colleghi, 1987).

Il glucano somministrato oralmente a topi con sviluppo di infezione cronica da candida ha condotto alla spiccata crescita dell'attività candidicida dei macrofagi alveolari e della milza. È cresciuta la resistenza non solo alla *Candida albicans*, ma anche allo *Staphylococcus aureus*, e nel contempo si è verificata la riduzione della crescita di microrganismi nel fegato degli animali colpiti, il  $\beta$ -glucano, inoltre, ha avuto effetto sinergico con il farmaco antimicotico Amphotericin B (Nicoletti e colleghi, 1992).

Durante gli esperimenti sui topi sono state osservati interessanti risultati durante l'applicazione di betaglucani prima, durante e dopo l'intervento. La mortalità complessiva si è ridotta di circa il 40% in seguito al calo della formazione del NF-kappa B (Nuclear Factor kappa B) e del NF-IL6 (Nuclear Factor Interleukin 6) (Williams e colleghi, 1999).

L'attività dei macrofagi è determinante nella terapia delle ferite superficiali della pelle, sia che si tratti di ferite accidentali o di ferite postoperatorie. Nell'applicazione superficiale i glucani attivano i macrofagi epidermici (le cellule di Langerhans) e hanno anche la facoltà di catturare i radicali liberi e agire così come sostanze fotoprotettive. L'applicazione porta alla riduzione dell'incidenza di eritemi della pelle e all'apporto di una quantità sufficiente di cellule di Langerhans nell'epiderma (Elmets, 1992). La terapia ausiliaria con betaglucani rende più compatta la pelle delle cicatrici e riduce l'insorgenza di infiammazioni. Gli esperimenti relativi alla terapia delle ferite con  $\beta$ -glucano hanno dimostrato un numero significativamente più alto di macrofagi al livello primario, infiammatorio di rinnovamento del tessuto. La riepitelizzazione del tessuto durante l'applicazione di glucani avviene sostanzialmente in modo più veloce che senza la loro applicazione.

L'applicazione locale di glucano durante la terapia di piaghe da decubito croniche ha condotto al 73% di miglioramenti, e al 27% di epitelizzazioni e chiusura delle piaghe da decubito (Leibovich e colleghi, 1980).

La dose giornaliera consigliata di betaglucano è secondo la maggior parte degli autori di 3-3000 mg, a seconda che sia usata preventivamente o come sostanza coadiuvante negli stati patologici. Negli USA il  $\beta$ -glucano è stato classificato come GRAS (Generally Recognized As Safe – Genericamente ritenuto sicuro. La classificazione è attribuita dalla FDA – Food and Drug Administration), effetti collaterali sono molto rari, in alcuni casi si possono verificare reazioni allergiche, si tratta tuttavia di casi in cui non è stata somministrata una forma sufficientemente pura di  $\beta$ -glucano (Jason e colleghi, 1984). I Beta-1,3-D- glucani non sono presenti in natura nel corpo umano e, pertanto, non esistono stati cagionati dalla loro insufficienza.

Per il miglioramento dell'assorbimento si consiglia l'assunzione del betaglucano a digiuno. È dimostrato che gli enterociti partecipano al trasporto dei beta 1,3 glucani e di componenti a essi affini attraverso le pareti cellulari del tratto intestinale nella linfa, dove iniziano a interagire con i macrofagi, il che ha per effetto il potenziamento del sistema immunitario (Frey e colleghi, 1996). Studi che sfruttano il marcamento radioattivo del betaglucano hanno dimostrato che particelle grandi e piccole (frammenti) di betaglucani si trovano nel siero del sangue, il che indica univocamente l'assimilazione dei glucani da parte del tratto intestinale (Tsukagoshi e colleghi, 1984).

Benché i beta 1,3 D glucani si riscontrino nei lieviti che si usano per la panificazione, nei chicchi di cereali come per esempio l'avena e l'orzo e in alcuni tipi di funghi, essi sono difficilmente utilizzabili al loro stato naturale "impuro". Il loro assorbimento da parte del tratto intestinale è in misura significativa dipendente dalla purezza e dall'accessibilità di questi composti (Jason e colleghi).

#### 4. Estrazione, frazionamento, purificazione e modificazione chimica

Durante gli ultimi decenni trascorsi sono stati sviluppati diversi metodi di estrazione dei polisaccaridi dai funghi, la maggior parte di essi è molto simile (Mizuno, 1999).

In primo luogo la farina secca di fungo o i funghi essiccati vengono ripetutamente scaldati in etanolo al 80% allo scopo di estrarre ed eliminare le sostanze bassomolecolari. Altre frazioni si ottengono per estrazione in acqua a 100°C per 3 ore, ossalato d'ammonio al 1% a 100°C per 6 ore e idrossido di sodio al 5% a 80°C per 6 ore. La successiva purificazione dei polisaccaridi include tecniche di concentrazione in alcool, la precipitazione frazionata, la precipitazione acida con acido acetico, la ionocromatografia sostitutiva, la filtrazione del gel e la cromatografia d'affinità (Mizuno, 1999).

Negli ultimi tempi sono stati osservati sforzi di aumentare l'attività dei polisaccaridi isolati dai funghi medicinali con diverse modificazioni chimiche, il cui risultato saranno alcuni prodotti semisintetici (la storia si ripete, così come è stato per la penicillina che oggi praticamente non si usa nella sua composizione originaria). La modificazione chimica si può realizzare con idrolisi ossidoriduttiva (degradazione di Smith) oppure anche con acido formico. Sono stati già rilevati alcuni risultati positivi, quest'orientamento della ricerca è tuttavia ancor sempre agli inizi (Mizuno, 1999).

Numerosi polisaccaridi isolati dai funghi hanno la facoltà di migliorare la funzionalità del sistema immunitario, la maggior parte di essi sono nella loro struttura di base dei  $\beta$ -1,3-D-glucani. Tutti hanno una struttura affine, la catena principale si compone di unità di  $\beta$ -D-glucopiranosio legate nelle posizioni 1,3, tra esse sono casualmente distribuite unità di  $\beta$ -D-glucopiranosio legate nelle posizioni 1,6, la struttura risultante è affine a una ragnatela (vedi fig. 2) e può avere conformazioni varie. La struttura fondamentale del  $\beta$ -1,3-D glucano è essenziale per le sue proprietà immunostimolanti, il grado di ramificazione si muove in una misura da 0,20 a 0,33. La struttura a triplice elica, che si forma nei polimeri con alto peso molecolare, è responsabile delle proprietà immunomodulanti dell'intero polimero e l'attività è indipendente da altre strutture specifiche. L'attività

di potenziamento dell'immunità dipende prevalentemente dalla struttura elicoidale e dalla presenza di gruppi idrofili localizzati sulla superficie esterna dell'elica. La maggior parte dei  $\beta$ -1,3-D glucani attivi è stata isolata dai funghi superiori Basidiomiceti (Bohn e colleghi, 1995).

Si dedica grande attenzione allo studio degli effetti medicinali dei polisaccaridi isolati da singoli tipi di funghi, l'attenzione maggiore tuttavia è rivolta ai cosiddetti funghi medicinali, i cui polisaccaridi sono in grado di fornire all'organismo umano un effetto immunostimolante di gran lunga più spiccato (Ghoneum e colleghi, 1995; Wedan e colleghi, 1997; Sawai e colleghi, 2002).

## 5. Sulla società Natures s.r.o.



La Natures s.r.o. è al 100% un'azienda privata, nata il 28/05/2001 e registrata nel Registro commerciale del Tribunale provinciale di Trnava, fascicolo N° 14545/T, con sede a Trnava, via A. Sládkoviča 33.

I proprietari della società hanno presentato alla Sezione Brevetti dell'Ufficio della proprietà industriale della Repubblica slovacca il modulo di registrazione N° 0499-2003 relativo alla scoperta di un procedimento per isolare il Betaglucano dal *Pleurotus ostreatus* e possiedono il know-how necessario alla produzione dell'immunostimolatore naturale Betaglucano.

La Natures s.r.o. collabora con le autorità più importanti nel campo della ricerca e dello sviluppo di polisaccaridi con effetti immunostimolanti e anticancerogeni in Slovacchia e all'estero.

Il Betaglucano è sul mercato mondiale uno degli immunostimolanti più potenti con un importante effetto anticancerogeno.

Il prodotto Betaglucano in polvere è approvato dall'Ufficio di salute pubblica della Repubblica slovacca con HHSR-552/2004-HŽPP/Trs.

Le compresse con contenuto di 24, 120 e 500 mg di Betaglucano sono approvate dall'Ufficio di salute pubblica della Repubblica Slovacca con HHSR-5583/2004-HŽPP/Ht, Ministero della Salute della Repubblica Ceca con HEM-350-24.11.04-34113 e Ministero della Salute della Repubblica Italiana No. 600.12/E 14847/15644 e 600.12/E 14847/23135, JFDA della Giordania No. 3/5/4/20892 e en la Federazione Russa.

## 6. Bibliografia

- Abel, G. & Czop, J.K.; - "Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta," *Int. J. Immunopharmacol*, 14: 1363-1373. 1992.
- Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch J, "Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women," *J Am Coll Nutr*. 1997 Feb; 16(1): 46-51
- Bohn, J.A. and BeMiller, J.N. 1995. (1-3)-  $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28, 3-14.
- Boldizar, I., Horvath, K., Szedlay, G. and Molnar-Perl, I. 1998. Simultaneous GC-MS quantitation of acids and sugars in the hydrolyzates of immunostimulants, water soluble polysaccharides of Basidiomycetes. *Chromatographia (Germany)* 47, 413-419.
- Borchers, A.T., Stern, J.S., Hackman, R.M., Keen, C.L., Gerschwin, M.E., 1999. Mushrooms, tumors and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 221, 281-293.
- Bousquet M, Escoula L, Peuriere S, et al., "Immunopharmacologic study in mice of 2 beta-1, 3, beta-1, 6 polysaccharides (scleroglucan and PSAT) on the activation of macrophages and T lymphocytes," *Ann Rech Vet*. 1989; 20(2): 165-73.
- Braaten JT, Wood PJ, Scott FW, et al., "Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects," *Eur J Clin Nutr*. 1994 Jul; 48(7): 465-74.
- Browder, L.W., Sherwood, E., Williams, D., Jones, E., McNamee R.B., DiLuzio, N.R., 1987. Synergistic effect of nonspecific immunostimulation and antibiotics in experimental peritonitis. *Surgery*, 102, 206-214.
- Czop JK, Valiante NM, Janusz MJ, "Phagocytosis of particulate activators of the human alternative complement pathway through monocyte beta-glucan receptors," *Prog Clin Biol Res*. 1989; 297:287-96.
- Davidson MH; Dugan LD; Burns JH, et al., "The hypocholesterolemic effects of beta-glucan in oatmeal and oat bran. A dose-controlled study," *JAMA*, 1991 Apr 10, 265:14, 1833-9.
- de Felipe Junior J, da Rocha e Silva Junior M, Maciel FM, et al., "Infection prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator beta 1-3 polyglucose (glucan)," *Surg Gynecol Obstet*. 1993 Oct; 177(4): 383-8.
- DiLuzio N.R. Williams D.L. et al, "Comparative evaluation of the tumor inhibitory and antibacterial activity of solubilized and particulate glucan," *Recent Results Cancer Res* 75:165-172. 1980.
- DiLuzio, N.R., McNamee, R.B., Williams, D.L., Gilbert, K.M., Spanjers, M.A., 1980. Glucan induced inhibition of tumor growth and enhancement of survival in variety of transplantable and spontaneous murine tumor models. *Adv Exp Med Biol*, 121, 269-290.
- Frey A; Giannasca KT; Weltzin R, et al., "Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting," *J Exp Med*, 1996 Sep 1, 184:3, 1045-59.
- Ghoneum, M., Wimbley, M., Salem, F., McKlain, A., Attalan, N. and Gill, G. 1995. Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC). *International Journal of Immunotherapy* 11, 23-28.
- Chihara G, "Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides," *Dev Biol Stand*. 1992; 77:191-7.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222, 687-688.
- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *GANN*, 59, 155-157.
- Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nankinishi, M. and Fukuoka, F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research* 29, 734-735.
- Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., Poutanen, K., 1998. Oat beta-glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 175-181.
- Jason C. Cooper, PharmD, Nannette Turcasso, PharmD., BCPS; "Immunostimulatory Effects of Beta-1, 3-glucan and Acemannan"; Medical University of South Carolina.
- Kidd, P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy. *Alternative Medicine Review* 5, 4-27.
- Lahnborg, G., Hedstrom, K.G., Nord, C.E., 1982. The effect of glucan – a host resistance activator – and ampicillin in an experimental intraabdominal sepsis. *J Reticuloendothel Soc*, 32, 347-353.
- Leibovich, S.J., Danon, D., 1980. Promotion of wound repair in mice by application of glucan. *J Reticuloendothel Soc*, 27, 1-11.
- Maeda, Y.Y., Watanabe, S.T., Chihara, C. and Rokutanda, M. 1988. Denaturation and renaturation of a  $\beta$ -1,6;1,3-glucan, lentinan associated with expression of T-cell mediated responses. *Cancer Research* 48, 671-675.
- Mansell PW, Ichinose H, Reed RJ, et al., "Macrophage-mediated destruction of human malignant cells in vivo," *J Natl Cancer Inst*. 1975 Mar; 54(3): 571-80.
- Mansell, P.W.A., Rowden, G., Hammer, C., 1978. Clinical experiences with the use of glucan. *Immune Modulation and Control of Neoplasia by Adjuvant Therapy*.
- McIntosh GH; Whyte J; McArthur R, et al., "Barley and wheat foods: influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men," *Am J Clin Nutr*, 1991 May, 53:5, 1205-9.
- Minato, K., Mizuno, M., Ashida, H., Hashimoto, T., Terai, H. and Tsuchida, H. 1999. Influence of storage conditions on immunomodulating activities of *Lentinus edodes*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 243-250.
- Minato, K., Mizuno, M., Kawakami, S., Tatsuoka, S., Denpo, Y., Tokimoto, K. and Tsuchida, H. 2001. Changes in immunomodulating activities and content of antitumor polysaccharides during growth of two mushrooms, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing and *Grifola frondosa* (Dicks:Fr.) S.F. Gray. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 1-7.

- Miura NN, Ohno N, Aketagawa J, et al., "Blood clearance of (1->3)-beta-D-glucan in MRL lpr/lpr mice," *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996 Jan; 13(1): 51-57.
- Miyazaki, H., Yoshikai, Y., Tanaka, M., Takeda, Y., Takeo, S., Nomoto, K., 1992. Protective effect of SPR-901 (RBS) on the decrease of peripheral leukocyte number in 5-fluorouracil treated mice. *Int J Immunopharmacol*, 14, 11-17.
- Mizuno, T. 1996. A development of antitumour polysaccharides from mushroom fungi. *Food Ingredients Journal (Japan)*, 167, 69-85.
- Mizuno, T. 1999. The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 9-29.
- Morikawa K, Takeda R, Yamazaki M, et al., "Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear beta-1, 3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells," *Cancer Res.* 1985 Apr; 45(4): 1496-501
- Nicoletti, A., Nicolette, G., Ferraro, G., Palmieri, G., Mattaboni, P., Germogli, R., 1992. Preliminary evaluation of immuno adjuvant activity of an orally administered glucan extracted from *Candida albicans*, *Arzneimittelforschung*, 42, 1246-1250.
- Nicolosi, R., Bell, S.J., Bistran, B.R., Greenberg, I., Forse, R.A., Blackburn, G.L., 1999. Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *Am J Clin Nutr*, 70, 208-212.
- Ohno, N., Adachi, Y. and Yadomae, T., 1988. Conformations of fungal  $\beta$ -D-glucans in the fruit body of edible fungi assessed by cross polarisation-magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1198-1204.
- Ooi, V.E., Liu, F., 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem*, 7, 715-729.
- Patchen ML; DiLuzio NR; Jacques P, et al., "Soluble polyglycans enhance recovery from cobalt-60—induced hemopoietic injury," *J Biol Response Mod*, 1984 Dec, 3:6, 627-33.
- Petruczenko A, "Glucan effect on the survival of mice after radiation exposure," *Acta Physiol Pol.* 1984 May-Jun; 35(3): 231-6.
- Reshetnikov, S.V., Wasser, S.P. and Tan, K.K. 2001. Higher Basidiomycetes as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 361-394.
- Saito, H., Yoshioka, Y., Uchara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S. and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1->3)- $\beta$ -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated antitumour activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydrate Research* 217, 181-190.
- Sakurai, T., Suzuki, I., Kinoshita, A., Oikawa, S., Masuda, A., Ohsawa, M., Yadomae, T., 1991. Effect of intraperitoneally administered beta-1,3-glucan (SSG) obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 on the functions of murine alveolar macrophages. *Chem Pharm Bull*, 39, 214-217.
- Sasaki, T. and Takasuka, N. 1976. Further study of the structure of lentinan, an antitumour polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Research* 47, 99-104.
- Sawai, M., Adachi, Y., Kanai, M., Matsui, S. and Yadomae, T. 2002. Extraction of conformationally stable (1-6)-branched (1-3)- $\beta$ -glucans from premixed edible mushroom powders by cold-alkaline solution. *International Journal of Medicinal Mushrooms* (in press).
- Seljelid R, Figenschau Y, Bogwald J, et al., "Evidence that tumor necrosis induced by aminated beta 1-3D polyglucose is mediated by a concerted action of local and systemic cytokines," *Scand J Immunol.* 1989 Dec; 30(6): 687-94.
- Sharon, N. and Lis, H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American Journal*, 74-81.
- Soltys J, Quinn MT, "Modulation of endotoxin- and enterotoxin-induced cytokine release by in vivo treatment with beta- (1,6)-branched beta- (1,3)-glucan," *Infect Immun.* 1999 Jan; 67(1): 244-52.
- Sveinbjornsson B, Rushfeldt C, Seljelid R, et al., "Inhibition of establishment and growth of mouse liver metastases after treatment with interferon gamma and beta-1, 3-D-glucan," *Hepatology.* 1998 May; 27(5): 1241-8.
- Teas J, "The dietary intake of Laminarin, a brown seaweed, and breast cancer prevention," *Nutr Cancer.* 1983; 4(3): 217-22.
- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, et al., "Krestin (PSK)," *Cancer Treat Rev*, 1984 Jun, 11:2, 131-55.
- Wakui A, Kasai M, Konno K, et al., "Randomized study of lentinan on patients with advanced gastric and colorectal cancer. Tohoku Lentinan Study Group," *Gan To Kagaku Ryoho.* 1986 Apr; 13(4 Pt 1): 1050-9.
- Wallmark A, Persson M, et al., "Consumption of oat milk for 5 weeks lowers serum cholesterol and LDL cholesterol in free-living men with moderate hypercholesterolemia," *Ann Nutr Metab.* 1999; 43(5): 301-9.
- Wasser SP, Weis AL, "Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective," *Crit Rev Immunol.* 1999; 19(1): 65-96.
- Wedam, W. and Hayes, A. 1997. Breast cancer. *Journal of Naturopathic Medicine* 7, 86-87.
- Welch, R.W., 1994. Can dietary oats promote health? *Br J Biomed Sci*, 51, 260-270.
- Williams DL, Ha T, Li C, et al., "Inhibiting early activation of tissue nuclear factor-kappa B and nuclear factor interleukin 6 with (1->3)-beta-D-glucan increases long-term survival in polymicrobial sepsis," *Surgery.* 1999 Jul; 126(1): 54-65.